

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00630

地塞米松对人肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞酪氨酸转氨酶活性诱导能力丧失的机制研究

李忆东, 刘宇健, 卢建*

第二军医大学基础部病理生理学教研室, 上海 200433

[摘要] 目的: 通过测定人肝癌 SMMC-7721 细胞酪氨酸转氨酶(TAT)cDNA 序列, 并观察其糖皮质激素受体(GR)通路是否存在异常, 以探讨地塞米松(Dex)丧失诱导 SMMC-7721 细胞 TAT 活性的机制。方法: RT-PCR 扩增 SMMC-7721 细胞全长 TAT cDNA 并进行测序; 采用实时定量 PCR 观察 Dex 对 SMMC-7721 细胞 TAT mRNA 表达的影响, 并与 HepG2 细胞作对照; 采用电穿孔法将 GR 特异性报告基因 GRE-tk-LUC 及 GRE-MMTV-CAT 分别瞬时转入 SMMC-7721 细胞中, 观察 Dex 对荧光素酶(LUC)和氯霉素乙酰转移酶(CAT)表达的影响, 并与 HepG2 细胞作对照。结果: SMMC-7721 细胞 TAT cDNA 中第 576 位碱基存在同义突变; Dex 能够诱导 SMMC-7721 细胞中 TAT mRNA 的表达, 最大诱导倍数为 2.22, 明显低于 HepG2 细胞(15.1 倍, $P < 0.01$); Dex 诱导了 SMMC-7721 细胞 LUC 及 CAT 的表达, 与 HepG2 细胞无显著差异。结论: Dex 对 SMMC-7721 细胞 TAT mRNA 诱导水平降低, 可能是 TAT 活性不增高的主要原因。

[关键词] 糖皮质激素; 受体; 酪氨酸转氨酶; 转录激活**[中图分类号]** R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)06-0630-04

Lost sensibility of tyrosine aminotransferase to dexamethasone in human hepatoma cell line SMMC-7721

LI Yi-dong, LIU Yu-jian, LU Jian*

Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the mechanism responsible for lost sensibility of tyrosine aminotransferase (TAT) to dexamethasone(Dex) in human hepatoma cell line SMMC-7721 through examining the cDNA sequence of TAT and the status of glucocorticoid receptor (GR) pathway. **Methods:** The TAT cDNA fragment containing the full length of coding sequence was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and was sequenced. The expression of TAT mRNA was determined by real-time quantitative PCR to observe the influence of Dex on expression of TAT mRNA in SMMC-7721 cells. The experiment with HepG2 cells was performed as the control. Reporter genes (GRE-tk-LUC and GRE-MMTV-CAT) were transiently transfected into SMMC-7721 cells by electroporation. The induction efficiencies of LUC and CAT genes expression by Dex were examined and compared between SMMC-7721 cells and HepG2 cells. **Results:** The results showed that there was a same-sense mutation (Gln576Gln) in TAT cDNA sequence. TAT mRNA could be induced by Dex, with the maximal induction level being 2.22-folds in SMMC-7721 cells, which was significantly lower than that in HepG2 cells (15.1-fold increase, $P < 0.01$). Dex induced the expression of LUC and CAT genes in SMMC-7721 cells as well as the HepG2 cells. **Conclusion:** The induction efficiency of Dex for expression of TAT mRNA is decreased in SMMC-7721 cells, which might be due to the unchanged activity of TAT.

[KEY WORDS] glucocorticoids; receptor; tyrosine aminotransferase; transcriptional activation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(6): 630-633]

糖皮质激素(glucocorticoid, GC)对机体的生长、发育、生殖、免疫及维持内环境稳定等几乎所有的过程都具有重要的调节作用, 其生物学效应的发挥主要是由糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)介导^[1-2]。酪氨酸转氨酶(tyrosine amin-

otransferase, TAT)基因是最早被确认的 GC 靶基因, GC 能够诱导 TAT 的表达已为众多的实验所证实^[3-5]。但国内外研究^[6-8]亦发现, 有些肝癌细胞经 GC 处理后, TAT 活性并不增高。我们的前期研究^[8-9]发现, 地塞米松(Dex)能够诱导 SMMC-7721

[收稿日期] 2008-01-29 **[接受日期]** 2008-03-04**[基金项目]** 国家自然科学基金重点项目(39730210). Supported by National Natural Science Foundation of China (39730210).**[作者简介]** 李忆东, 讲师. E-mail: bingsheng@81890.net

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25070322, E-mail: lujian326@163.com

细胞 TAT mRNA 表达,且具有剂量依赖性和时间依赖性,但 TAT 的活性无明显改变。众所周知,肿瘤细胞在发生和发展过程中会经历多种基因突变,其中包括一些原来对激素敏感的基因在癌变后,变得不敏感了,最为典型的是雌激素依赖性的乳腺细胞和雄激素依赖的前列腺细胞在癌变后,有相当一部分乳腺癌细胞和前列腺癌细胞可以变成激素非依赖性的^[10]。这提示肿瘤对激素不敏感的机制具有重要的理论意义和临床价值,因此也成为肿瘤内分泌领域的研究热点之一。为进一步探讨 SMMC-7721 细胞丧失 Dex 诱导 TAT 活性的机制,本研究对 SMMC-7721 细胞 TAT cDNA 序列进行了测定,并观察了 GC 诱导靶基因表达的通路是否存在异常。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 人肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞为我校病理教研室于 1977 年建立的细胞系^[8]。质粒 GRE-tk-LUC 由 Dr. Simmons (Steroid Hormones Section, NIDDK/CEB, NIH) 惠赠,质粒 GRE-MMTV-CAT、 β -Gal 由 Dr. G. Hager (Laboratory of Receptor Biology and Gene Expression, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, NIH) 惠赠,质粒 PRL-SV40 为 Promega 公司产品。地塞米松(Dex)为 Sigma 公司产品。电穿孔仪为 Bio-Rad 公司产品。CAT ELISA、 β -Gal ELISA 试剂盒为 Boehringer Mannheim 公司产品。LUC、PRL-SV40 检测试剂盒为 Promega 公司产品。小量胶回收试剂盒为上海华舜公司产品。

1.2 RT-PCR 扩增 SMMC-7721 细胞的 TAT cDNA 采用一步法抽提 SMMC-7721 细胞总 RNA,琼脂糖凝胶电泳结果显示 RNA 保持了良好的完整性,紫外分光光度法确定 RNA 的量和纯度。根据人 TAT 基因序列,合成全长 TAT cDNA 扩增引物;上游序列为 5'-GAG CTA AGG GAG CTT TCG GG-3';下游序列为 5'-GGA GAA TGG ATG CAG GCC TA-3',扩增片段长度约为 1 450 bp。以总 RNA 为模板按逆转录试剂盒上的说明进行逆转录反应。反应条件为:25℃ 10 min,42℃ 60 min,70℃ 10 min。PCR 反应体系总体积为 20 μ l,反应条件为:94℃ 变性 1 min,65℃ 退火 1.5 min,72℃ 延伸 1.5 min,共扩增 40 个循环,于最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经胶回收后交由上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.3 实时定量 PCR 检测 Dex 对 SMMC-7721 细胞 TAT mRNA 的诱导 用含不同浓度 Dex(10^{-9} ~

10^{-6} mol/L)的培养液处理 SMMC-7721 细胞 16 h,采用实时定量 PCR 方法检测 TAT mRNA 的表达水平,以人肝癌细胞株 HepG2(本校东方肝胆外科研究所惠赠)作为阳性对照^[11]。TAT 扩增片段上游引物序列为:5'-ACA GAC CCT GAA GTT ACC C-3';下游引物序列为:5'-AAG AAG CAA TCT CCT CCC-3'。内参照 β -actin 上游引物序列为:5'-CAT CCT CAC CCT GAA GTA CCC-3';下游引物序列为:5'-AGC CTG GAT AGC AAC GTA CAT G-3'。反应总体积为 20.0 μ l,包括 100 ng 的 DNA 模板(TAT 用 100 ng, β -actin 用 50 ng),2 μ l 的 10 \times buffer,0.5 μ l 的 dNTP,1.6 μ l 的 Mg^{2+} ,0.3 μ l 的 20 mmol/L 的上下游引物,0.3 μ l (5 U/ μ l)的 Taq 酶,1.0 μ l 的 20 \times SYBR 试剂。94℃,5 min,之后 94℃,15 s,61℃,20 s,72℃,15 s,38 个循环,然后 72℃,10 min。

1.4 糖皮质激素受体特异性报告基因的瞬时转染及活性检测 SMMC-7721 细胞常规培养于含 10% 小牛血清和抗生素的 1640 培养液中,置于 37℃、CO₂ 体积分数 5% 的培养箱中孵育,每 4~5 d 传代 1 次。取对数生长期细胞(细胞总数不少于 10^7),0.125% 胰酶消化后收集细胞于无菌的 50 ml 离心管中,2 000 r/min($R=15$ cm)离心 5 min,以冰预冷的 PBS 洗涤细胞沉淀 2 次。将细胞悬液及 40 μ g 报告基因质粒[荧光素酶(LUC)和氯霉素乙酰转移酶(CAT)]及内参照质粒(pRL-SV40、 β -Gal)加入冰预冷的 Cuvette 中(总体积为 800 μ l)。冰浴 10 min 后,将 Cuvette 置于电穿孔仪中,250 V、960 μ F 条件下行电穿孔,将报告基因及内参照质粒共转染入 SMMC-7721 细胞中,冰浴 10 min,将细胞悬液移入培养瓶中,37℃ 培养,24 h 后,用含不同浓度 Dex (10^{-9} ~ 10^{-6} mol/L)的诱导培养液继续培养 48 h,获取细胞参照试剂盒说明检测 LUC、CAT 的活性。实验仍以 HepG2 细胞作为阳性对照。

1.5 统计学处理 采用单因素方差进行组间显著性差异检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SMMC-7721 细胞中 TAT cDNA 序列的测定 采用 RT-PCR 方法扩增 SMMC-7721 细胞的全长 TAT cDNA(图 1A),并对其序列进行了测定。结果(图 1B)显示,TAT cDNA 第 576 位碱基发生突变,即 G \rightarrow A,相应的密码子变化为 CAG \rightarrow CAA,但 CAA 也编码 Gln,此突变属同义突变。上述结果表明该细胞 TAT 蛋白的一级结构无改变。



图 1 SMMC-7721 细胞 TAT 基因 cDNA 的扩增与序列分析

Fig 1 Amplification and sequences analysis of TAT gene in SMMC-7721 cells

A: RT-PCR products. 1: λ DNA/*Hind* III + *Eco*R I markers; 2: Fragment amplified with human TAT specific primers; 3: 200 bp DNA Ladder. B: Sequences of TAT cDNA in SMMC-7721 cells and human TAT gene. *: Mutation in sequence

2.2 Dex 对 SMMC-7721 细胞 TAT mRNA 表达的影响 实时定量 PCR 结果表明(图 2): Dex 能够上调 SMMC-7721 细胞 TAT mRNA 的表达,与对照组相比, 10^{-6} mol/L Dex 处理时诱导倍数最大,为 2.22 倍,但与 HepG2 细胞结果相比(10^{-6} mol/L Dex 处理时最大诱导倍数为 15.1 倍), Dex 对 SMMC-7721 细胞 TAT mRNA 的诱导水平明显降低($P < 0.01$),提示 Dex 对 TAT mRNA 诱导水平的降低可能是 TAT 活性不增高的主要原因。

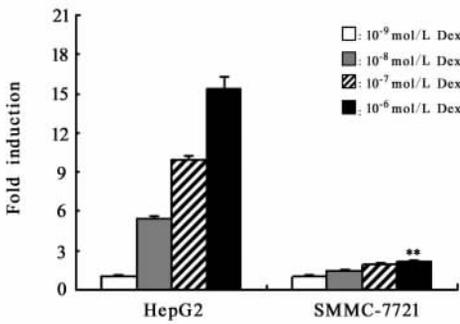


图 2 Dex 对 SMMC-7721 细胞 TAT mRNA 表达的影响

Fig 2 Effect of Dex on expression of TAT mRNA in SMMC-7721 cells

** $P < 0.01$ vs HepG2 cells

2.3 SMMC-7721 细胞中 GR 转录激活功能的研究 Dex 能够以剂量依赖性的方式上调 SMMC-7721 细胞中 LUC 的表达,最大诱导倍数 23 倍;且在各浓度下 SMMC-7721 细胞 LUC 活性与 HepG2 细胞无统计学差异(图 3A); GRE-MMTV-CAT 转染后的结果(图 3B)与 LUC 类似。

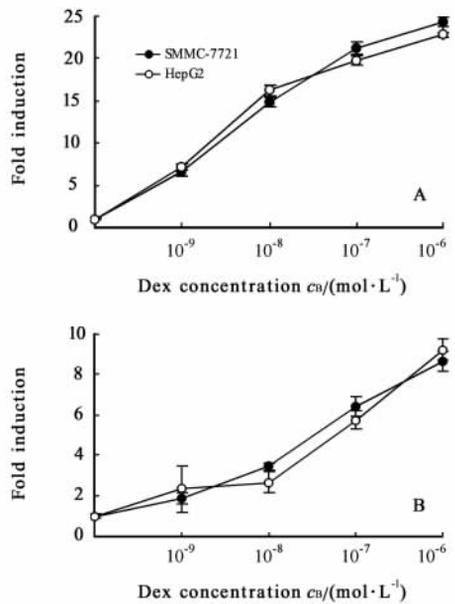


图 3 Dex 对 SMMC-7721 细胞 GR 特异性报告基因表达的影响

Fig 3 Induction of report gene expression by Dex in SMMC-7721 cells

A: Cells were electroporated with GRE-tk-LUC plasmid DNA; B: Cells were electroporated with GRE-MMTV-CAT plasmid DNA

3 讨论

目前认为,GC 调节基因表达的基本模式是,GC 与 GR 结合导致 GR 的活化,活化的 GR 转位至核内并以同源二聚体的形式与靶基因中的糖皮质激素反应元件(glucocorticoid response element, GRE)结合,之后通过共调节因子与基础转录机器成分相互作用,促进或抑制靶基因的表达,引起生物学效应^[12-14]。

本研究扩增了 SMMC-7721 细胞 TAT cDNA 并对序列进行了测定,结果发现第 576 位碱基发生突变(G→A),相应的密码子变化为 CAG→CAA,但二者均编码 Gln,此突变属同义突变。测序结果表明,TAT 蛋白一级结构并无改变,因此 Dex 处理后 SMMC-7721 细胞 TAT 活性不增高并非 TAT 酶结构改变所致,而可能是酶量减少的结果。

研究^[15-16]表明,GC 对 TAT 诱导主要是在转录水平上的调节,TAT 活性增高与 TAT mRNA 增高及 TAT 酶蛋白合成增加相关。为探讨 Dex 诱导 TAT 的表达量是否存在异常,本研究采用实时定量 PCR 方法,观察了 Dex 对 SMMC-7721 细胞 TAT mRNA 表达的影响。结果显示,Dex 能够诱导 SMMC-7721 细胞 TAT mRNA 的表达,且具有剂量依赖性,最大诱导倍数为 2.22 倍,但与 HepG2 细胞相比,Dex 对 SMMC-7721 细胞中 TAT mRNA 的诱导水平明显降低。由此推测 TAT mRNA 的转录异常可能是 SMMC-7721 细胞丧失 Dex 诱导 TAT 的主要原因。

Dex 对 TAT mRNA 诱导水平降低的原因可以是 TAT 基因的调控区(如启动子或增强子)有问题,也可能是 GC-GR 的信号转导通路有问题,如 GR 的结构或转录功能异常、与 GR 作用有关的共调节因子的异常等。本实验室前期研究^[8]证实 SMMC-7721 细胞中存在 GR,且 GR 数量明显增多,是正常细胞的 20 倍。故本研究进一步通过观察了 Dex 对外源性报告基因表达的影响,以探讨 SMMC-7721 细胞中 GR 的转录激活功能是否存在异常。结果显示,Dex 可以使报告基因的活性明显提高,表明该细胞中的 GR 具有转录激活功能。同时,Dex 能够诱导该细胞 GC 特异性报告基因的表达进一步提示,该细胞中 GR 的结构及共调节因子的结构、功能也是正常的。因为只有这样,GR 与 Dex 结合后,才能经历在正常细胞中所发生的变化,包括受体激活、变构、核转位并与报告基因上游的 GRE 结合,在共调节因子的参与下促进报告基因的表达。

本实验为阐明 SMMC-7721 细胞丧失 Dex 诱导 TAT 活性的机制做了初步的研究,排除了 TAT 基因突变导致酶结构改变及 GR 转录激活功能异常的可能,发现 Dex 未能诱导 SMMC-7721 细胞 TAT 活性升高可能是由于其未能提高 TAT mRNA 的表达量,这种转录水平的降低可能与 TAT 基因调控序列或转录后水平异常有关,其具体机制仍有待进一步研究证实。

[参考文献]

[1] Einstein M, Greenlee M, Rouen G, Sitlani A, Santoro J, Wang C, et al. Selective glucocorticoid receptor nonsteroidal ligands

completely antagonize the dexamethasone mediated induction of enzymes involved in gluconeogenesis and glutamine metabolism [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004, 92: 345-356.

- [2] Chinenov Y, Rogatsky I. Glucocorticoids and the innate immune system: crosstalk with the toll-like receptor signaling network [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2007, 275(1-2): 30-42.
- [3] Yoh T, Nakashima T, Sumida Y, Kakisaka Y, Nakajima Y, Ishikawa H, et al. Effects of glycyrrhizin on glucocorticoid signaling pathway in hepatocytes [J]. *Dig Dis Sci*, 2002, 47: 1775-1781.
- [4] Sevaljevic L, Isenovic E, Vulovic M, Macvanin M, Zakula Z, Kanazir D, et al. The responses of rat liver glucocorticoid receptors and genes for tyrosine aminotransferase, alpha-2-macroglobulin and gamma-fibrinogen to adrenalectomy-, dexamethasone- and inflammation-induced changes in the levels of glucocorticoids and proinflammatory cytokines [J]. *Biol Signals Recept*, 2001, 10: 299-309.
- [5] Nimi S, Yamaguchi T, Hayakawa T. Effect of dexamethasone pretreatment on the dexamethasone-dependent induction of tyrosine aminotransferase activity in primary cultured rat hepatocytes [J]. *Biol Pharm Bull*, 1998, 21: 1009-1012.
- [6] Thompson E B, Aviv D, Lippman M E. Variants of HTC cells with low tyrosine aminotransferase inducibility and apparently normal glucocorticoid receptors [J]. *Endocrinology*, 1977, 100: 406-419.
- [7] 盛宗梅, 陈惠黎. H615 肝癌和 Hep A 腹水肝癌的酶学比较 II. 酪氨酸- α -酮戊二酸转氨酶的活力及诱导的变化 [J]. *上海第一医学院学报*, 1983, 10: 283-288.
- [8] 卢建, 徐仁宝, 董荣春. 人体肝癌细胞系(SMMC-7721)的糖皮质激素受体以及糖皮质激素对酪氨酸转氨酶的诱导 [J]. *实验生物学报*, 1985, 18: 231-238.
- [9] 李忆东, 刘宇健, 卢建. 地塞米松对人肝癌细胞系酪氨酸转氨酶 mRNA 表达的影响 [J]. *第二军医大学学报*, 2002, 23: 176-178.
- [10] 叶华茂, 孙颖浩, 许传亮, 王林辉, 侯建国, 高旭, 等. 雄激素非依赖性前列腺癌细胞亚系模型 LNCaP-AI 的建立 [J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29: 59-62.
- [11] Gerbal-Chaloin S, Daujat M, Pascussi J M, Pichard-Garcia L, Vilarem M J, Maurel P. Transcriptional regulation of CYP2C9 gene. Role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 209-217.
- [12] Cole T J, Mollard R. Selective glucocorticoid receptor ligands [J]. *Med Chem*, 2007, 3: 494-506.
- [13] Distelhorst C W. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2002, 9: 6-19.
- [14] Szapary D, Song L N, He Y, Simons S S Jr. Differential modulation of glucocorticoid and progesterone receptor transactivation [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2008, 283(1-2): 114-126.
- [15] Sassi H, Fromont-Racine M, Grange T, Pictet R. Tissue specificity of a glucocorticoid-dependent enhancer in transgenic mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92: 7197-7201.
- [16] Seralini G E, Luu-Thé V, Labrie F. Cloning and expression of human tyrosine aminotransferase cDNA [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1260: 97-101.